

OLIGONUCLEOTIDES INHIBANT L'EXPRESSION DE LA PROTEINE OB-RGRP
ET PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES MODIFIANT L'INTERACTION
ENTRE LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE OB-RGRP ET LE RECEPTEUR DE
LA LEPTINE

5

La présente demande a pour objet des oligonucléotides inhibant l'expression de la protéine OB-RGRP et leurs utilisations pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.

Elle est en outre relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie entre d'une part des protéines de fusion composées de récepteurs de la leptine et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie et d'autre part de des protéines de fusion composées de OB-RGRP ou de MYO47 et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie.

Elle a de plus pour objets des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé.

La leptine est une protéine de 16 kDa sécrétée principalement par le tissu adipeux, et se liant à un récepteur (OB-R) appartenant à la famille des récepteurs aux cytokines. Cinq isoformes membranaires de ce récepteur ont été identifiées, et dérivent de l'épissage alternatif d'un même gène. Ces isoformes qui possèdent le même domaine extracellulaire et transmembranaire, sont caractérisées par des domaines intracellulaires de tailles variables (Tartaglia et al. (1995) Cell 83, 1263-1271). Une forme soluble du récepteur a aussi été identifiée et provient d'un épissage alternatif ou d'un clivage protéolytique du domaine extracellulaire des formes membranaires. La forme courte du récepteur (OB-Rs) qui semble impliquée dans le transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique est l'isoforme la plus exprimée. La forme longue (OB-RI) est seulement exprimée dans quelques tissus comme l'hypothalamus et semble responsable de la plupart des effets biologiques de la leptine (Sweeney, G. (2002) Cell Signal 14, 655-663). La leptine et son récepteur ont été l'objet d'une attention particulière à

cause de leur implication dans la régulation de la balance énergétique, du métabolisme, et dans la réponse neuroendocrine à la prise alimentaire. Récemment, il a été montré que la leptine est aussi impliquée dans des fonctions additionnelles importantes comme la régulation de la masse osseuse, l'angiogénèse, la cicatrisation, la formation de thrombus, la maturation sexuelle, l'hématopoïèse, la régulation de l'immunité et de l'inflammation, le développement foetal et le cancer. L'administration de leptine chez des organismes déficients en leptine comme les souris (ob/ob) et certains individus humains provoque une diminution de la masse de lipide dans divers tissus comme le foie et le tissu adipeux (Halaas et al. (1995) Science 269, 543-546, Pelleymounter et al. (1995) Science 269, 540-543, Campfield et al. (1995) Science 269, 546-549, Farooqi et al. (1999) N Engl J Med 341, 879-884). Ce traitement par la leptine améliore aussi la sensibilité à l'insuline et diminue la masse grasse chez la souris et l'homme présentant une lipodystrophie (Shimomura et al. (1999) Nature 401, 73-76, Oral et al. (2002) New England Journal of Medicine 346, 570-578, Petersen et al. (2002) J Clin Invest 109, 1345-1350). Les personnes obèses sont généralement résistantes à la leptine. Les raisons de cette résistance sont encore mal comprises mais plusieurs mécanismes ont été suggérés : un défaut de transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique, un défaut d'activation des OB-R ou de la signalisation de ces récepteurs, et la surexpression de régulateurs négatifs comme SOCS3 et PTP-1B (Bjorbaek et al. (2000) J Biol Chem 275, 40649-40657, Cheng et al. (2002) Developmental Cell 2, 497-503, Cook et Unger (2002) Developmental Cell 2, 385-387). La compréhension des mécanismes de la résistance à la leptine requiert une caractérisation plus détaillée des mécanismes impliqués dans l'activation des OB-R.

OB-R est constitutivement associé à la janus kinase 2 (JAK2). La liaison de JAK2 au récepteur est critique pour la signalisation par les OB-R et a été proposée comme étant impliqué dans la stabilisation des dimères de récepteurs OB-R. L'activation par des agonistes provoquerait un changement

de conformation dans la région juxta membranaire de la queue cytoplasmique des OB-R. JAK2, qui est constitutivement reliée au motif box1 dans cette région est activée par autophosphorylation puis phosphoryle le récepteur OB-RI mais pas OB-Rs. La phosphorylation d'OB-RI permet l'ancrage de protéines STAT qui se lient au récepteur et sont activées par phosphorylation sur tyrosine. Les protéines STAT activées dimérisent et transloquent dans le noyau pour stimuler la transcription de gènes via des éléments de réponse aux STAT (Tartaglia (1997) J Biol Chem 272, 6093-6096).

Récemment, un second promoteur pour le récepteur de la leptine a été découvert. De façon intéressante, un second transcrit est co-exprimé avec les messagers des OB-R depuis ce promoteur. Ce transcrit a été observé dans plusieurs espèces comme la souris, le rat, l'homme, la levure et *C. elegans* (Bailleul et al. (1997) Nucleic Acids Res 25, 2752-2758). Des expériences d'hybridation *in situ* confirment la co-expression des OB-R et du gène associé dans le cerveau de la souris y compris les régions hypothalamiques impliquées dans la régulation du poids corporel (Mercer et al., J Neuroendocrinol 2000 Jul;12(7):649-55). La protéine correspondante est composée de 131 acides aminés et est appelée OB-R-gene related protein (OB-RGRP). Cette protéine a fait l'objet de la demande de brevet WO98/05792.

Le fait qu'OB-RGRP soit exprimée chez la levure et le nématode, organismes dépourvus de récepteurs de la leptine, indique un rôle plus général pour OB-RGRP, supporté par la délétion de cette protéine chez la levure qui provoque un défaut de transport des protéines du golgi vers les vacuoles (Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708).

En 2001, un ADNc appelé MY047, a été cloné à partir d'une banque d'ADNc de cerveau humain (Huang et al. (2001) Biochimica et Biophysica acta. Gene structure and expression 327-331). Cette protéine a en outre fait l'objet de la demande EP 0 969 091. La fonction de la protéine correspondante est encore inconnue. MY047 a 68 % d'homologie avec OB-RGRP suggérant que ces deux protéines appartiennent à la même famille. L'analyse des séquences

disponibles du projet de séquençage du génome humain montre qu'il n'existe aucun autre homologue.

Les demandeurs se sont attachés à déterminer le rôle de la OB-RGRP et ses relations avec les récepteurs de la leptine.

- 5 Ils ont ainsi montré la spécificité des interactions entre la OB-RGRP et le récepteur OBRs.

- Ils ont en outre montré qu'il était possible de modifier spécifiquement l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire à l'aide d'oligonucléotides antisens dirigés contre la protéine associée au gène
10 des récepteurs de la leptine (OB-RGRP).

- La présente a donc pour objet des oligonucléotides éventuellement modifiés comprenant de 8 à 50 nucléotides qui hybrident de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 1 et inhibent l'expression de OB-RGRP. Avantageusement, ces oligonucléotides favorisent l'expression des
15 récepteurs de la leptine à la surface cellulaire.

Préférentiellement ces oligonucléotides sont des antisens.

Préférentiellement ces oligonucléotides sont caractérisés en ce qu'il comprennent une séquence présentant une identité d'au moins 60 %, 70 %, 80 % ou 90 % avec la séquence SEQ ID N° 2.

- 20 Selon un mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides sont caractérisés en ce que des nucléotides sont thioestérifiés.

Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides sont caractérisés en ce que des nucléotides sont 2' O-méthylés.

- Selon un autre mode de mise en œuvre avantageux ces oligonucléotides
25 sont caractérisés en ce qu'il présentent un résidu triéthylèneglycol à leurs extrémités 3'.

Bien que la forme la plus usitée de composés antisens se présente sous la forme d'oligonucléotides antisens, la présente invention inclut les dérivés d'oligonucléotides et les composés mimant leur structure tels que ceux décrits

ci-après, sans que cette liste soit limitative. Les composés antisens en accord avec cette invention comprennent de préférence, de 8 à 50 nucléobases (c'est-à-dire sont des oligomères formés de 8 à 50 unités nucléotidiques). Les composés antisens particulièrement visés sont les oligonucléotides antisens, plus spécialement ceux qui sont formés d'environ 12 à 30 nucléobases. Les composés antisens comprennent les ribozymes, les oligozymes et autres ARN catalytiques courts ou oligonucléotides catalytiques qui s'hybrident avec l'acide nucléique cible et modulent son expression. Un nucléoside est une combinaison d'une base azotée et d'un sucre. La base d'un nucléoside est généralement une base azotée hétérocyclique. Les deux types de base hétérocycliques les plus communs sont les bases puriques et pyrimidiques. Les nucléotides sont des nucléosides qui portent un groupement phosphate lié de manière covalente au sucre du nucléoside. Pour les nucléosides comportant un pentanofurannose, le phosphate peut être lié à l'hydroxyle en position 2', 3' ou 5' du sucre. La formation de nucléotides provient de l'attachement covalent du groupement phosphate à deux nucléosides adjacents ce qui permet de proche en proche l'obtention d'un oligomère linéaire. Les deux extrémités d'un tel polymère linéaire peuvent à leur tour se joindre pour former une structure circulaire, mais la structure ouverte est généralement préférée. Dans la structure nucléotidique, les groupements phosphate sont considérés comme formant le squelette internucléosidique de l'oligonucléotide. La liaison normale dans le squelette d'ARN ou d'ADN est un lien phosphodiester 3'-5'. Des exemples spécifiques de composés antisens utilisables dans cette invention incluent des oligonucléotides contenant une ossature modifiée ou des liaisons internucléosidiques non-naturelles. Ainsi des oligonucléotides à ossature modifiée comprennent ceux qui conservent un atome de phosphate dans leur squelette et ceux qui en sont dépourvus. Pour les besoins de la présente invention, des oligonucléotides modifiés ne possédant pas d'atome de phosphore dans leur liaison internucléosidique peuvent malgré tout être considérés comme des oligonucléotides. L'ossature de ces oligonucléotides modifiés peut comprendre par exemple des

groupements phosphorothioates, phosphorothioates chiraux, phosphorodithioates, phosphotriesters, aminoalkylphosphotriesters, méthyl et autres alkyl phosphonates y compris les 3'-alkylène phosphonates, 5'-alkylène phosphonates et phosphonates chiraux, des groupements phosphinates, 5 phosphoramidates y compris 3'-amino phosphoramidate and aminoalkylphosphoramidates, thionophosphoramidates, thionoalkylphosphonates, thionoalkylphosphotriesters, sélénophosphates and borophosphates formant des liaisons normales, 3'-5', et leurs analogues formant des liaisons 2'-5', ainsi que ceux qui présentent une polarité inversée, 10 c'est-à-dire comprenant au moins une liaison internucléosidique de type 3'-3', 5'-5' ou 2'-2'. La forme d'oligonucléotides possédant une polarité inversée préférentiellement utilisée est celle possédant la première liaison internucléosidique en 3' est de type 3'-3'. Ceci correspond à un seul résidu nucléosidique inversé, qui peut par ailleurs être abasique, c'est-à-dire dans 15 lequel la base azotée hétérocyclique est manquante ou remplacée par un groupement hydroxyle. Les diverses formes (salines ou acide libre) sont incluses dans le champ de cette invention.

L'ossature des oligonucléotides modifiés dépourvus d'atome de phosphore est préférentiellement formée de courtes chaînes alkyles ou cycloalkyles, y 20 compris leurs dérivés comportant un ou plusieurs hétéroatomes, servant de liaison internucléosidique. Ce type d'ossature peut être à base de liaison morpholino (constituée en partie par le sucre du nucléoside), de siloxane, de formacétyle et thioformacétyle, de méthylène formacétyle et méthylène thioformacétyle, de riboacétyle, d'alcènes, de sulfamates, de sulfonate et 25 sulfonamide, de méthylène imine et méthylène hydrazine, d'amide, et de tout autre groupement comportant divers atomes d'azote, de soufre et d'oxygène ou des groupes méthyle.

Pour d'autres analogues d'oligonucléotides, le sucre et la liaison internucléosidique (c'est-à-dire l'ossature) sont à la fois remplacés dans la 30 structure nucléotidique par de nouveaux groupes. La base azotée hétérocyclique est conservée pour assurer l'hybridation avec l'acide nucléique

cible. De tels composés oligomères, les PNA (pour Peptide Nucleic Acid), ont montré une excellente capacité d'hybridation. Dans ces composés, le squelette de l'oligonucléotide est remplacé par une ossature à base d'amide, en particulier par l'aminoéthyl glycine, greffée directement ou indirectement sur les bases azotées. De plus amples renseignements sur ces PNA peuvent être trouvés dans Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497.

L'invention incorpore plus particulièrement des oligonucléotides à ossature phosphorothioate, amide et morpholine, et les oligonucléosides à squelette à hétéroatomes, plus précisément :

- 10 -CH₂-NH-O-CH₂-
- CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- (dénommé squelette méthylène-(méthylimino) ou MMI)
- CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-
- CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂-
- O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- (dans lequel le pont phosphodiester est : O-P-O-CH₂).

- 15 La modification des oligonucléotides peut également porter sur les sucres : les substitutions préférées sont en position 2' (F; dérivés O-, N- ou S-alcanes, O-, N- ou S-alcènes ou O-, N- ou S-alcynes de longueur C1 à C11, substitués ou non) en particulier, les dérivés préférés sont :

- O-[(CH₂)_nO]_m-CH₃
- 20 O-(CH₂)_n-O-CH₃
- O-(CH₂)_n-NH₂
- O-(CH₂)_n-CH₃
- O-(CH₂)_n-O-NH₂
- O-(CH₂)_n-O-N[(CH₂)_n-CH₃]₂

- 25 où n et m varient de 1 à 10.

D'autres modifications de la position 2' incluent les groupes suivants : chaînes aliphatiques substituées ou non de longueur C1 à C10, aryles, aryles-alkyles et alkyles-aryles; -SH, -SCH₃, -OCN, -Cl, -Br, -CN, -CF₃, -OCF₃, -SO₂CH₃, -ONO₂, -NO₂, -N₃, -NH₂; silyles substitués; groupement "rapporteur"; groupement intercaleur; groupement de clivage de l'ARN; groupement pour

améliorer les capacités pharmacodynamiques d'un oligonucléotide. Les modifications préférées incluent les groupements :

2'-méthoxyéthoxy ($2'\text{-O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, également appelé 2'-O-(2-méthoxyéthyl) ou 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78f 486-504)

5 2'-diméthylaminooxyéthoxy ($\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, également appelé 2'-DMAOE

2'-diméthylaminoéthoxyéthoxy ($2'\text{-O-CH}_2\text{OCH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2$, également appelé 2'-diméthylaminoéthoxyéthyl or 2'-DMAEOE).

Une autre modification intéressante conduit à la formation de LNA (Locked Nucleic Acids) dans lesquels l'hydroxyle en position 2' est lié au carbone en position 3' ou 4' du sucre, formant alors un sucre à structure bicyclique. Le pontage préféré se fait par un lien méthyle ou éthyle entre l'oxygène 2' et le carbone en 4'.

D'autres substitutions préférées en position 2' incluent :

- 15 -O-CH₃ (2'-méthoxy)
 -O-(CH₂)₃-NH₂ (2'-aminopropoxy)
 -CH₂-CH=CH₂ (2'-allyle)
 -O-CH₂-CH=CH₂ (2'-O-allyle)
 -F (2' fluoro).

20 Ces modifications en 2' peuvent se présenter en position ribo (bas) ou arabino (haut). Le substituant 2' fluoro est le préféré en position arabino.

Des modifications similaires peuvent être faites sur d'autres positions, en particulier en position 3' du sucre du nucléotide en extrémité 3'-terminale ou dans les oligonucléotides à ossature 2'-5', et en position 5' du sucre en extrémité 5'-terminale. Les sucres des oligonucléotides peuvent également être remplacés par des analogues (par exemple un cyclobutyl peut être substitué à un pentofurranyl).

Les oligonucléotides peuvent aussi comporter des modifications ou substitutions au niveau des nucléobases (bases hétérocycliques azotées appelées "bases" par l'homme de l'art). Les bases naturelles (non modifiées)

sont les purines (adénine A et guanin G) et les pyrimidines (cytosine C, thymine T et uracile U). Parmi les bases modifiées sont incluses des molécules naturelles ou synthétiques telles que 5-méthylcytosine, 5-hydroxyméthylcytosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadénine; 6-méthyl, 2-méthyl et autres dérivés alkylés des bases puriques (A et G); dérivé 2-thio (C, T et U); dérivé 5-halo (U, C); dérivé 5-propynyl (U et C) cytosine; dérivé 6-azo (U, Tet C); 5-uracile; 4-thiouracile; 8-halo, 8- amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl autres adénines et guanines substituées en position 8; 5-halo (en particulier 5-bromo), 5- trifluoromethyl et autres uraciles and cytosines substituées en position 5; 7-méthylguanine and 7-méthyladénine; 2-fluoro-adénine; 2-amino-adénine; 8-azaguanine et 8-azaadénine; 7-déazaguanine et 7-déazaadénine; 3-déazaguanine et 3-déazaadénine. Dans les autres bases modifiées, on trouve les pyrimidines tricycliques telles que phénoxazine cytidine(1H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)- one), phénothiazine cytidine (1H-pyrimido[5,4- b][1,4]benzothiazin-2(3H)-one), phénoxazine cytidine substituées (comme la 9-(2-aminoethoxy)-H-pyrimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-one), carbazole cytidine (2H-pyrimido[4,5-b]-indol-'2-one).

Les bases modifiées comprennent les composés dont l'hétérocycle purique ou pyrimidique est remplacé par un autre hétérocycle par exemple 7-déazaadénine, 7-déazaguanosine, 2-aminopyridine ou 2-pyridone (The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859" Kroschwitz, J.I., ed. John Wiley & Sons, 1990; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S.T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993). Certaines de ces bases modifiées peuvent être d'un grand intérêt pour augmenter l'affinité des composés oligomériques de l'invention, comme les pyrimidines substituées en position 5, les azapyrimidines, les purines N- et O- substituées (telles que la 2-aminopropyladénine, la 5-propynyl uracile, la 5-propynyl cytosine). Les 5-méthylcytosines substituées ont un effet positif sur la stabilité des duplex

oligomères-acides nucléiques (Sanghvi Y.S. & Crooke S.T, and Lebleu, B., eds. Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) et sont la substitution préférée, en particulier en combinaison avec les modifications 2'-méthoxyéthyl des sucres.

5 Préférentiellement ces oligonucléotides sont sous la forme simple brin.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux ces oligonucléotides comprennent une séquence présentant une identité d'au moins 60 %, préférentiellement 70 %, 80 % ou 90 %, avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 10 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont thioestérifiés.

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement avantageux ces oligonucléotides comprennent une séquence présentant une identité d'au moins 60% avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 et/ou 20, dans le sens 5' vers 3', sont 2' O-méthylés. 15

Préférentiellement les oligonucléotides selon la présente invention sont des ADN.

La présente invention a encore pour objet des oligonucléotides de type ARNi (Acide Ribonucléique Interférant) comprenant de 10 à 60 nucléotides, et 20 préférentiellement de 15 à 25 nucléotides, caractérisés en ce qu'ils hybrident de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 21 et inhibent l'expression de OB-RGRP.

Préférentiellement de tels ARNi comprennent 17 ou 19 nucléotides pris en continu dans la séquence SEQ ID N° 21, ou dans sa séquence 25 complémentaire.

Ces ARNi peuvent être double-brins, auquel cas ils sont avantageusement constitués de deux brins comprenant de 15 à 60 nucléotides. Selon un mode de mise en œuvre préférentiel, un tel ARNi est celui dont au moins l'un des deux brins comprend une séquence présentant une identité d'au moins

60 %, préférentiellement 70 %, 80 % ou 90 %, avec l'une des séquences SEQ ID N°37 ou SEQ ID N°38.

Ces ARNi peuvent aussi être exprimés sous forme simple brin. De tels ARNi peuvent alors comprendre une boucle. Ils comprennent avantageusement de
 5 15 à 60 nucléotides. Selon un mode de mise en œuvre préférentiel, un tel ARNi comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60%, préférentiellement 70%, 80% ou 90%, avec la séquence SEQ ID N°42.

Des nucléotides A(A/G) et (C/T)T peuvent être ajoutés respectivement en 5' et en 3' de cette séquence de 17 ou 19 nucléotides. D'autres types de résidus
 10 ou groupes chimiques peuvent néanmoins être ajoutés à ces deux extrémités, pour autant qu'ils ne diminuent pas l'activité des antisens.

Les modifications de nucléotides décrites pour les antisens sont aussi possibles pour ceux entrant dans la composition des sARNi.

La présente invention inclut également toutes modifications des antisens ou
 15 des ARNi, visant à augmenter la résistance de ces composés aux nucléases cellulaires, ou leur pénétration dans les cellules et/ou leur efficacité dans le ciblage de la séquence d'OB-RGRP.

Lorsqu'ils sont des ADN, les oligonucléotides selon la présente invention peuvent être réalisés commodément et en routine par la technique bien
 20 connue de la synthèse en phase solide. L'équipement pour une telle synthèse est vendu par différentes sociétés spécialisées telles que Applied Biosystems (Foster City, CA). La synthèse des antisens dans la présente invention a fait appel à une synthèse chimique sur un support adapté selon les méthodes connues de l'homme du métier, en particulier décrites par E. Uhlmann, A.
 25 Peyman, A. Rytte, A. Schmidt and E. Buddecke (1999, Methods in Enzymology 313: 268-284) et par E. Uhlmann (Recent advances in the medicinal chemistry of antisense oligonucleotides, Current Opinion of Drug Discovery and Development 3: 203-213, 2000). Tout autre procédé de synthèse connu de l'homme du métier peut aussi être employé.

Lorsqu'ils sont des ARNi les oligonucléotides selon la présente invention peuvent être synthétisés par synthèse chimique, lorsqu'il s'agit de ARNi synthétiques, exprimés in situ à l'aide de vecteurs permettant la synthèse de tels oligonucléotides ou obtenus par clivage in vitro d'un ARN double brin par la RNase III ou l'enzyme DICER.

Les ARNis (ARNi small ou petits ARNi) peuvent être obtenus auprès de différents fournisseurs comme Proligo (Proligo France SAS 1 rue Robert et Sonia Delaunay 75011 Paris) Dharmacon (Dharmacon, Inc. 1376 Miners Drive #101 Lafayette, CO 80026) et Ambion (Ambion (Europe) Ltd. Ermine Business Park Spitfire Close Huntingdon, Cambridgeshire PE29 6XY United Kingdom), ou peuvent être synthétisés à partir de kits commercialisés par différentes sociétés comme Dharmacon et Ambion.

Préférentiellement les ARNi selon la présente invention sont sous forme double brin.

Après synthèse les ARNi sont tout d'abord repris dans de l'eau dépourvue de RNases. L'appariement des deux molécules simple brin peut être réalisé comme suit : 20 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de chaque brin est mélangé dans le tampon d'appariement (100 mmol.L^{-1} d'acétate de potassium, 30 mmol.L^{-1} d'HEPES-KOH pH 7,4, 2 mmol.L^{-1} d'acétate de magnésium) puis chauffé à 90°C pendant 1 min suivit par une incubation d'1 h à 37°C.

La transfection des ARNis peut se faire par le même protocole que pour la transfection des antisens.

Une alternative pour le ARNi est l'utilisation de vecteurs permettant la synthèse d'ARN antisens spécifiques du gène à éteindre et qui vont s'apparier dans les cellules transfectées pour donner un ARNis. Un premier système de vecteur permet l'expression d'une séquence antisens par deux promoteurs en sens inverse, de chaque côté de cette séquence, donnant naissance à deux ARN complémentaires qui vont s'apparier dans les cellules transfectées et donner un ARNis. Un autre système de vecteur met en jeu la synthèse d'un ARN présentant la séquence d l'antisens suivie de la séquence sens, espacée par quelques nucléotides, qui va créer une structure

d'ARN en épingle a cheveu, qui va être clivée dans les cellules transfectées pour donner un ARNi. Encore un autre système de vecteur met en jeu l'expression d'un ARN double brin, long jusqu'à 600 paires de bases qui ne peut sortir du noyau faute des séquences nécessaires : pas de coiffe en 3' (site ribozyme), ni de queue poly-A en 5' (site de fixation de la protéine à doigt de zing MAZ). Cet ARN long est clivé dans le noyau pour donner des ARNi fonctionnels qui vont sortir dans le cytoplasme et provoquer la dégradation de l'ARN cible.

La transfection de ces vecteurs s'effectue de manière classique comme décrit ci-avant pour les différents ADN. L'obtention de lignées stables qui présentent une extinction du gène cible est réalisable par une sélection par antibiotique classiquement utilisée pour l'obtention de lignées.

De manière générale, l'homme du métier peut se référer pour les ARNi aux publications suivantes : Elbashir S.M. et al. (2001, *Nature* **411**: 494-498), Elbashir S.M. Lendeckel W. and Tuschl T. (2001, *Genes & Dev.* **15**:188-200) et Masters J.R., et al. (2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8012-8017).

Des vecteurs permettant l'expression des ARNi peuvent être obtenus comme décrit par Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. (2002. *Science* **296**: 550-553), Yu J.Y., DeRuiter S.L., and Turner D. (2002, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6047-6052) et Shinagawa T. et Ishii S. (2003, *Genes & Dev.* **17**:1340-1345).

De tels vecteurs, ainsi que des cellules contenant de tels vecteurs sont des objets de la présente demande.

La présente invention a encore pour objet des médicaments contenant de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules et des compositions pharmaceutiques contenant une quantité pharmacologiquement active de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

Un autre objet d la présente invention est l'utilisation de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules pour la fabrication d'un médicament pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.

Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de
5 maladies liées à la leptine consistant à administrer de tels oligonucléotides, vecteurs et cellules à un patient atteint par la dite maladie.

Un autre objet de l'invention est un procédé de détermination de la modification de l'interaction entre la OB-RGRP ou la protéine MYO47, ou une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec cette protéine ou avec
10 la protéine MYO47, et le récepteur de la leptine par un composé.

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé, ainsi qu'à des acides nucléiques codant ces protéines.

Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine consistant à administrer un ligand sélectionné par
15 le procédé défini ci-dessus à un patient atteint par la dite maladie.

Un premier objet de la présente invention est donc une protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'une séquence présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4, ou la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de
20 la séquence SEQ ID N°16, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.

Les protéines de fusion selon la présente invention sont composées en substance d'une partie correspondant à une partie ou la totalité d'une
25 séquence présentant une identité d'au moins 65 % préférentiellement d'au moins 75 %, et encore plus préférentiellement d'au moins 85 % ou 95 %, avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une partie correspondant à une protéine donneur ou accepteur d'énergie.

Elles peuvent néanmoins comprendre d'autres séquences d'acides aminés, issues d'autres protéines, telles que des séquences signal.

De manière avantageuse la protéine donneur d'énergie est la luciférase de Renilla (Rluc). Elle peut néanmoins être toute autre protéine donneur d'énergie telle que le spectre d'émission du donneur chevauche suffisamment le spectre d'excitation de l'accepteur pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les deux partenaires. Elle peut ainsi être la GFP, si le transfert d'énergie est le FRET, ou encore l'aequorine si le transfert d'énergie est le CRET. L'aequorine peut être obtenue et utilisée comme décrit dans la demande de brevet EP0 187 519, ou dans l'article de Inouye et al. (PNAS USA 82 : 3154-3158 (1985)).

La protéine fluorescente accepteur d'énergie est quant à elle préférentiellement la DsRed, la GFP ou un mutant de cette protéine, tel que la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, la Topaz, ou la GFP₁₀. Elle peut néanmoins être toute autre protéine fluorescente accepteur d'énergie telle que le spectre d'excitation de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur se chevauchent suffisamment pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les deux partenaires.

Ces protéines sont connues de l'homme du métier qui peut trouver leurs séquences dans la littérature, notamment dans le revue de Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)). En particulier la GFP est décrite par Tsien (Annu. Rev. Biochem. 67 : 509-544 (1998)) et son clonage par Prasher et al. (Gene 111 : 229-233 (1992)). Le clonage de la DsRed est quant à lui décrit par Matz et al. (Nat. Biotechnol. 17 : 969-973 (1999)). Pour la Rluc, l'homme du métier peut se référer à Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)) ou encore à Lorenz et al. (PNAS 88: 4438-4442 (1991)).

De manière particulièrement avantageuse les protéines de fusion donneur et accepteur présentent l'une des séquences SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQID N°14, SEQID N°18 ou SEQID N°20 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

D'autres objets de la présente invention sont des acides nucléiques codant pour ces protéines. De tels acides nucléiques peuvent être des ADN complémentaires ou génomiques, ou des ARN. Ces acides nucléiques ou polynucléotides peuvent être sous forme simple chaîne ou sous la forme de
 5 duplex.

Ils sont de manière particulièrement avantageuse des ADN complémentaires.

De manière préférentielle l'invention a pour objet un acide nucléique ayant une identité d'au moins 65 %, préférentiellement d'au moins 75 %, et encore plus préférentiellement d'au moins 85 % ou 95 %, d'identité en nucléotides
 10 avec un acide nucléique de séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°11, SEQID N°13, SEQID N°17 ou SEQID N°19.

Selon encore un autre aspect, l'invention est relative à un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique tel que défini ci-avant, et plus particulièrement un acide
 15 nucléique de séquences nucléotidiques SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°11, SEQID N°13, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une
 20 fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptide dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne
 25 comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'acide aminé identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le
 30 nombre de positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus

d'acides aminés par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de mars 1996, BLAST 2.0.4 de février 1998 et BLAST 2.0.6 de septembre 1998), en utilisant exclusivement les paramètres par défaut (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence « requête » de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions suivantes :

1- Compétition des membranes et PRE HYBRIDATION :

- 20 - Mélanger : 40µl ADN sperme de saumon (10mg/ml)+ 40 µl ADN placentaire humain (10mg/ml)
- Dénaturer 5 min à 96°C, puis plonger dans la glace le mélange.
- Oter le SSC 2X et verser 4 ml de mix formamide dans le tube d'hybridation contenant les membranes.
- 25 - Ajouter le mélange des deux ADNs dénaturés.
- Incubation à 42°C pendant 5 à 6 heures, avec rotation.

2- Compétition de la sonde marquée :

- Ajouter à la sonde marquée et purifiée 10 à 50 µl ADN Cot I, selon la quantité de répétitions.
- 30 - Dénaturer 7 à 10 mn à 95°C.
- Incuber à 65°C pendant 2 à 5 heures.

3- Hybridation :

- Oter le mix de pré hybridation.
- Mélanger 40 µl ADN sperme de saumon + 40 µl ADN placentaire humain ; dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace.
- 5 - Ajouter dans le tube d'hybridation 4 ml de mix formamide, le mélange des deux ADN et la sonde marquée/ADN Cot I dénaturée.
- Incuber 15 à 20 heures à 42°C, avec rotation.

4- Lavages :

- Un lavage à température ambiante dans du SSC 2X, pour rincer.
- 10 - 2 fois 5 minutes à température ambiante SSC 2X et SDS 0,1% à 65°C.
- 2 fois 15 minutes à 65°C SSC 1X et SDS 0,1% à 65°C.

Envelopper les membranes dans du Saran et exposer.

- Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur variable de 20 nucléotides à plusieurs centaines de nucléotides.
- 15

- Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.
- 20

- Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) ou encore dans l'ouvrage de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y).
- 25

- Les protéines objets de la présente invention peuvent être obtenues par tous moyens connus de l'homme du métier. Elles sont néanmoins avantageusement obtenues par xpression des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus, codant pour ces protéines, éventuellement insérés dans
- 30

des vecteurs d'expression, dans des cellules avantageusement choisies, suivie éventuellement par une extraction et une purification qui peut être totale ou partielle.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un
5 acide nucléique selon l'invention.

Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

a) un acide nucléique codant pour une protéine ayant au moins 65 % d'identité en acides aminés avec une séquence SEQID N°6, SEQID
10 N°8, SEQID N°18 ou SEQID N°20 ou un fragment peptidique ou un variant de cette dernière ;

b) un acide nucléique comprenant un polynucléotide ayant une séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

c) un acide nucléique ayant au moins 65% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique ayant une séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

d) un acide nucléique hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQID N°5, SEQID
20 N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

Par « vecteur » au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

25 Selon un mode de réalisation, le vecteur d'expression comprend, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

30 (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;

(2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et

(3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

- 5 En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de réplication chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des marqueurs ou des marqueurs de sélection.

A titre d'exemples, les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le
10 promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989, "Molecular Cloning : A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring
15 Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.) ou encore aux techniques décrites par FULLER et al. (1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al).

Les vecteurs préférés selon l'invention sont des plasmides, tels que par exemple les vecteurs pCDNA3 (Invitrogen), pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen),
20 psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharming) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

- 25 Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par FLOTTE et al. (1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356.
30

La présente invention a en outre pour objets des cellules comprenant une protéine, un acide nucléique ou un vecteur tels que décrits ci dessus, ou des fragments de ces cellules, des lysats de ces cellules ou encore des membranes de ces cellules.

- 5 De telles cellules peuvent être cellules isolées d'un organisme et cultivées dans un milieu de croissance adéquat. Elles sont néanmoins préférentiellement des lignées cellulaires. Ainsi de telles lignées sont de manière particulièrement avantageuse les lignées cellulaires HEK 293, COS (ATCC N°CRL 1650), COS-M6 et HeLa (ATCC N°CCL2), ou encore Cv 1
10 (ATCC N°CCL70), Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), CHO (ATCC N°CCL-61) ou 3T3 (ATCC N°CRL-6361).

Les membranes de ces cellules peuvent être préparées par toute méthode connue de l'homme du métier.

- Préférentiellement elles seront préparées par broyage mécanique des
15 cellules puis centrifugation des suspensions obtenues, comme illustré dans les exemples qui suivent.

La présente invention est en outre relative à des compositions comprenant des cellules telles que décrites ci dessus et de la saponine.

- La présente invention est en outre relative à un procédé de détermination de
20 la modification de l'interaction entre la OB-RGRP, la protéine MY047, ou une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité
25 d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

-à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

De manière préférentielle, ledit composé est mis en contact avec une
 5 protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat

Préférentiellement ledit procédé est mis en œuvre avec des cellules traitées
 10 par un agent perméabilisant les cellules tel que la saponine.

Les protéines de fusion donneur d'énergie et les protéines de fusion accepteur d'énergie sont choisies de manière à ce que l'énergie résultant de l'activation du donneur puisse être transférée de manière efficace à l'accepteur.

15 Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion avec la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, auquel cas le substrat est avantageusement la coelenterazine.

Dans un mode de mise en œuvre préférentiel dudit procédé, la protéine de
 20 fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion avec la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

25 Dans un autre mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester et de la leptine (ou un ligand du récepteur), est comparé à celui mesuré en présence du composé en absence de leptine (ou un ligand du récepteur).

Préférentiellement le procédé est mis en oeuvre sur des membranes des cellules, telles que décrites ci dessus.

De manière préférentielle les protéines donneur et accepteur selon la présente invention sont choisies afin que le transfert d'énergie se fasse par
 5 BRET (pour Bioluminescence Resonance Energy Transfer ou ou transfert d'énergie de bioluminescence par résonance) de première ou deuxième génération, ou LRET (pour Luminescence Resonance Energy Transfer ou ou transfert d'énergie de luminescence par résonance). Néanmoins un tel transfert d'énergie peut être effectué par FRET (pour Fluorescence
 10 Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de fluorescence par résonance) ou encore par CRET (pour Chemiluminescence Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de chimioluminescence par résonance).

Quelque soit le type de transfert d'énergie les couples protéine de fusion
 15 donneur/ protéine de fusion accepteur d'énergie sont choisis afin de permettre un tel transfert.

Le BRET2 (2ème génération) consiste en un transfert d'énergie entre la luciférase de *Rénilla* , et une GFP mutante, la GFP₁₀, utilisant un substrat adéquate, la coelantérazine DeepblueC™ (Biosignal Packard).

20 Le CRET consiste en un transfert d'énergie entre l'aequorine, qui est une luciférase, et la GFP.

Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux protéines de la famille des GFP ayant des spectres différents.

Pour la mise en oeuvre de ces transferts l'homme du métier peut se référer à
 25 Ramsay D et al. (Biochem J 365: 429-40 (2002)) et à Yoshioka K et al. (FEBS Lett 523: 147-151 (2002)) pour le BRET2, à Baubet et al. (PNAS USA 97 : 7260-7265 (2000)) pour le CRET, à Matyus (J Photochem Photobiol B 12: 323-337 (1992)) et Pollok et Heim (Trends Cell Biol 9:57-60 (1999)) pour le FRET.

Un autre objet de la présente invention est un procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

Préférentiellement la protéine présentant une identité d'au moins 65 avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16 est la OB-RGRP ou MY047.

- Le procédé selon la présente invention est compatible avec les plaques à 96 ou 384 puits généralement utilisées. Il ne nécessite pas l'utilisation de molécules radioactives, est sensible, reproductible, rapide et le résultat est facile à lire. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour la mise en oeuvre de criblage à grande échelle.
- La présente invention est en outre relative à l'utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :
 - mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

Elle a enfin pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine ou à son récepteur comprenant les étapes de :

-sélection dudit composé par un procédé consistant à :

+mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité

5 d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et

+à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins

10 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine

-d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie.

Des pathologies liées à la leptine peuvent être des maladies liées à une diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à

15 l'inverse celles liées à une calcification importante.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur le poids, telles que l'obésité, le diabète ou l'anorexie.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur la maturation sexuelle l'hématopoïèse, l'angiogenèse, la formation de thrombus, la
20 régulation de l'immunité et de l'inflammation, le développement foetal, la cicatrisation et le cancer.

Les composés de l'invention, oligonucléotides, ARNi, ou autres composés, peuvent être formulés dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse,
25 intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges
30 de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment

lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

La formulation de compositions thérapeutiques et leur administration est dans les compétences de l'homme du métier.

- 5 La formulation des composés peut inclure différents produits connus de l'homme du métier. Préférentiellement, les composés peuvent être par exemple additionnés de sels, comme le sodium, le potassium, l'ammonium, le magnésium, le calcium, les polyamines, l'acide hydrochlorique, hydrobromique, sulfurique, phosphorique, ou nitrique. D'autres sels sont
- 10 également utilisables, comme ceux provenant de l'acide acétique, oxalique, tartrique, succinique, maléique, fumarique, gluconique, citrique, malique, ascorbique, benzoïque, tannique, palmitique, alginique, polyglutamique, naphthalènesulfonique, methanesulfonique, p-toluenesulfonique, naphthalènedisulfonique, polygalacturonique. Enfin, on peut aussi
- 15 préférentiellement utiliser des sels de chlorure, bromure et iodure.

La composition et la formulation pour l'administration topique peuvent inclure des patchs transdermiques, des pommades, des lotions, des crèmes, des gels, des gouttes, des suppositoires, des sprays, des liquides et des poudres.

- 20 La composition et la formulation pour l'administration orale peuvent inclure des poudres, des granules, des microparticules, des nano particules, des suspensions, des solutions aqueuses ou non, des capsules, des capsules de gel, des sachets, des tablettes ou mini tablettes. Des épaississants, des arômes, des diluants, des émulsifiants, des aides à la dispersion ou des liants peuvent être ajoutés.

- 25 La composition et la formulation pour l'administration parentérale, intrathécale ou intra ventriculaire, peut inclure des solutions aqueuses stériles qui peuvent aussi contenir des tampons, des diluants et autres additifs comme, mais non limité à des agents augmentant la pénétration, des produits transporteurs et des excipients.

La composition peut-être formulée et utilisée comme une mousse, une émulsion, une microémulsion, des liposomes cationique, sensibles au pH ou négativement chargés, et des transféromes.

D'une façon générale, les différentes formulations peuvent contenir un
 5 mélange d'un ou plusieurs agents, comme mais non limité à des agents augmentant la pénétration du composé (surfactants, sels biliaires, agents chélateurs, surfactant non chélateurs), des excipients (liants, remplisseurs, lubrifiants, désintégrants, agents mouillant), des transporteurs (eau, solutions
 10 salines, alcools, polyéthylène glycol, gélatine, lactose, amylose, stéarate de magnésium, talc, acide silicique, paraffine visqueuse, hydroxyméthylcellulose, polyvinylpyrrolidone). D'autres composants peuvent être ajoutés, comme des colorants, des arômes, des conservateurs, des antioxydants, des opacifiants, des agents épaississeurs et des stabilisateurs.

Le dosage est dépendant de la sévérité et de la sensibilité de l'état de la
 15 maladie à traiter, avec une durée de traitement pouvant aller de quelques jours à quelques mois, ou jusqu'à ce que la cure soit efficace ou qu'une diminution de la maladie soit observée. Le dosage optimal peut être calculé à partir de mesures d'accumulation de l'agent thérapeutique dans le corps du patient. L'homme du métier peut facilement déterminer les dosages optimum,
 20 les méthodes de dosage et les taux de répétitions de ces dosages. Les dosages optimum peuvent varier en fonction de l'efficacité relative de chaque oligonucléotide ou ARNi, et peuvent en général être estimés par la mesure des EC50 des doses utilisées in vitro et in vivo dans des modèles animaux. En général, le dosage est compris entre 0,01µg et 100 g par kilo du poids
 25 corporel et peut être administré une fois ou plus, de façon journalière, hebdomadaire, mensuelle ou annuelle, ou même une fois toutes les 2 à 20 années.

Des personnes compétentes peuvent facilement déterminer le taux de répétition des dosages basé sur le temps de présence du composé dans les
 30 fluides corporels ou les tissus. Suite à un traitement réussi, il peut être

désirable que le patient continue une thérapie de maintenance pour prévenir la réapparition de la maladie, pour ce faire l'oligonucléotide ou l'ARNi sont administrés à des doses de maintenance allant de 0,01µg à 100 g par kilo du poids corporel, une fois ou plus par jour jusqu'à une fois tous les 20 ans.

- 5 L'administration d'antisens in vivo a été réalisée avec succès par divers auteurs, utilisant des protocoles d'injection simple d'antisens par voie intraveineuse (He et al. (1998) Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 12:1-4) ou intracérébrale (Yoburn et al. (2003) Synapse 47: 109-116, Tischkau et al. (2003) J. Biol. Chem. 278: 718-723). Ces deux dernières
- 10 années, des systèmes plus complexes permettant le ciblage d'antisens dans l'organisme ont été développés et utilisés avec succès (Morishita et al. (2002) J. Endocrinol. 175: 475-485, Bartsch et al. (2002) Pharm. Res. 19: 676-680), permettant chez la souris et le rat, de traiter divers cancers (Rait et al. (2002) Mol. Med. 8: 475-486, Ochiatti et al. (2002) J. Drug. Target 10: 113-121, Eder
- 15 et al. (2002) Cancer Gene Ther. 9:117-125). La transfection des antisens met en jeu les mêmes procédés que pour la transfection des ARNi, laissant envisager les mêmes applications in vivo pour les ARNi. Dans cette optique, nous pouvons imaginer un ciblage de l'antisens ou des ARNi au niveau du système nerveux central, pour traiter des troubles dont l'origine est centrale
- 20 (obésité), mais aussi ceux obtenus par une action périphérique des récepteurs de la leptine. Plus particulièrement, une action des antisens ou des ARNi au niveau du transport de la leptine au travers de la barrière hémato-encéphalique et impliquant les OB-R peut être envisagée. D'ailleurs, les cellules endothéliales ont déjà été ciblées avec succès par une stratégie
- 25 antisens in vivo (Bartsch et al. (2002) Pharm. Res. 19: 676-680).

Figures :

Figure 1

Séquences des différents ODN antisens utilisés AS 01 à AS 16.

Figur 2

- 30 Alignement des séquences protéiques d'OB-RGRP de différentes espèces et de la séquence protéique humaine de MY047. Les domaines

transmembranaires potentiels ont été déterminés par différentes méthodes (HMMTOP, TMHMM, TopPred2, Tmpred) et sont écrites en gras.

Figure 3

Topologie d'OB-RGRP étudiée par BRET, par l'utilisation de la double
 5 protéine de fusion YFP-OB-RGRP-Luc. Figure 3a: représentation
 schématique de la topologie d'OB-RGRP pour le modèles 3 et 4TM. Figure
 3b : Résultats des expériences de BRET utilisant les protéines indiquées. Les
 données sont exprimées en mBU.

Figure 4

10 Etude de l'oligomérisation d'OB-RGRP par des expériences de SDS-PAGE et
 immunoprécipitations. Figure 4a: Les cellules exprimant les protéines de
 fusion indiquées ont été traitées ou non avec du Dithiobis(succinimidyl
 propionate) (DSP) 2 mmol.L⁻¹ dans du PBS (1X pH7,4) pour cross-linker les
 complexes protéiques. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et les
 15 protéines de fusions avec la YFP ont été détectées par l'utilisation d'un
 anticorps spécifique anti-YFP. Figure 4b: Les cellules exprimant la
 construction 6Myc-OB-RGRP ont été solubilisées avec 1 % de digitonine ou
 5 % de SDS et le solubilisé a été immunoprécipité avec un anticorps anti-
 myc. Les précipitats ont été soumis à une séparation par SDS-PAGE et les
 20 protéines étiquetées avec myc ont été détectées avec un anticorps anti-myc.

Figure 5

Identification des déterminants moléculaires impliqués dans l'oligomérisation
 d'OB-RGRP. Les protéines de fusions avec les tronctions d'OB-RGRP ont
 été traitées comme décrit Fig. 4b. TM, domaine transmembranaire.

25 Figure 6

Etude de l'oligomérisation d'OB-RGRP dans les cellules HEK vivantes par la
 technologie de BRET. Figure 6a: Les protéines de fusion indiquées ont été
 co-exprimées à un rapport équimolaire, et des expériences de mesures de
 BRET ont été réalisées. Figure 6b: Des quantités constantes du plasmide
 30 OB-RGRP-Luc ont été co-exprimées avec des quantités croissantes du
 plasmide d'OB-RGRP-YFP et des mesures d BRET ont été réalisées.

MT2R-Luc, protéine de fusion du récepteur MT2 de la mélatonine avec la luciférase.

Figure 7

Interaction d'OB-R_s et d'OB-RGRP et MY047 étudiées par BRET. Les protéines de fusions indiquées ont été co-exprimées à un rapport équimolaire et des mesures de BRET ont été réalisées. IR-YFP, protéine de fusion du récepteur de l'insuline avec la YFP.

Figure 8

Activation dose dépendante des gènes rapporteurs pour STAT3 (Figure 8a) et STAT5 (Figure 8b) dans des cellules HeLa, par OB-R_l en présence d'une sur-expression des constructions de la protéine OB-RGRP comme indiquées.

Figure 9

Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface des cellules. Des cellules HEK 293 transfectées ou non avec le vecteur d'expression d'OB-RGRP, et des cellules COS transfectées avec les vecteurs d'expression d'OB-R_l ou OB-R_s et +/- les vecteurs d'OB-RGRP, ont été utilisées pour déterminer la quantité de récepteurs exprimés à la surface et le total exprimé dans les cellules par des expériences de liaison de ¹²⁵I-leptine.

Figure 10

Effet des différents oligodésoxynucléotides (ODN) antisens sur le niveau des messagers d'OB-RGRP observés par RT-PCR semi-quantitative. Figure 10a: détermination de la zone linéaire d'amplification des transcrits d'OB-RGRP et de la GAPDH, en fonction du nombre de cycles PCR. Figure 10b: quantification des résultats montrés dans le panneau a. Figure 10c: Détermination des niveaux d'expression relatifs des ARNm d'OB-RGRP à 26 cycles PCR, dans les cellules incubées avec les différents ODN antisens.

Figures 11

Effet des différents ARN interférant sur le niveau des messagers d'OB-RGRP observés par RT-PCR semi-quantitative. **Figure 11a:** séquence SEQ ID N°37 /SEQ ID N°38 de l'ARNi synthétique utilisé (homologue pour l'homme et

la souris). **Figur 11b:** détermination des niveaux d'expression relatifs des ARNm d'OB-RGRP à 26 cycles PCR, dans des cellules HELA transfectées ou non avec l'ARNi synthétique. **Figure 11c:** séquence SEQ ID N°42 de l'ARNi en épingle à cheveux synthétisé à partir du vecteur PCR3.1-RNAi 14.

- 5 **Figure 11d:** détermination des niveaux d'expression relatifs des ARNm d'OB-RGRP à 26 cycles PCR, dans des cellules Ltk transfectées ou non avec le vecteur PCR3.1-RNAi 14.

Figure 12

- Effet des ODN antisens spécifiques d'OB-RGRP sur l'activation d'un gène rapporteur STAT3. Les cellules HeLa ont été co-transfectées, d'abord avec le vecteur d'expression OB-RI et les constructions des gènes rapporteurs pour STAT3 ou 5, puis avec les ODN antisens indiqués. Après 48 heures de stimulation ou non avec 10 nmol.L⁻¹ de leptine.
- 10

Figure 13

- Effet des ODN antisens spécifiques d'OB-RGRP sur l'expression en surface des OB-R. Les cellules HeLa ont été transfectées ou non avec les plasmides d'expression d' OB-R_I ou d'OB-R_S avant une seconde transfection ou non avec les ODN antisens indiqués. 48 h post-transfection, la quantité d'OB-R totale et la fraction exposée à la surface a été déterminée dans des expériences de liaison avec de la ¹²⁵I-leptine.
- 15
- 20

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

Matériels et Méthodes utilisés dans les exemples

Construction des plasmides.

- Les protéines de fusions des OB-R avec la YFP et la luciférase ont été construites par ligation de la YFP et de la Luciférase à la partie C-terminale des récepteurs d'OB-R, par des techniques standards de biologie moléculaire. La région codante de la YFP a été obtenue à partir du vecteur Cytogem®-Topaze (pGFPTpz-N1) (Packard, Meriden, CT) et fut inséré dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) contenant un polylinker modifié. La région codante de la *Renilla* luciférase a
- 25
- 30

été obtenue à partir du vecteur pRL-CMV (Promega, Madison, WI) et insérée dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3 modifié. Les régions codantes d'OB-R_l et d'OB-R_s (gift of Dr. Gainsford, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australie) ont été insérée dans les deux vecteurs décrits ci-dessus, respectivement dans les sites EcoR1/BamH1 et Nhe1. Les codons stop ont été supprimés par mutagenèse dirigée et la phase des protéines de fusion a été ajustée en même temps.

Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP a été obtenu par insertion de la région codante d'OB-RGRP, obtenue depuis le vecteur pCDNA3-Di1, dans les sites EcoR1 et Xba1 du vecteur pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Pays-bas). Le codon stop d'OB-RGRP a été supprimé par mutagenèse dirigée. Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP-Luc a été obtenu par digestion du vecteur pRL-CMV N3 (Promega, Madison, WI) avec Sma1 et Hpa1 et par insertion du fragment, correspondant à la région codante de la *Renilla* luciférase, après la région codante d'OB-RGRP dans le site BspE1 rempli du vecteur pcDNA3-OB-RGRP.

Le vecteur pcDNA3-YFP a été obtenu par sous-clonage de la région codante de la YFP à partir du vecteur pGFPTpz-N1 (Packard, Meriden, CT) inséré dans le site EcoRV du vecteur pcDNA3/CMV. Le vecteur pcDNA3-OB-RGRP-YFP a été obtenu par insertion du fragment BamH1/BspE1 du vecteur pcDNA3-OB-RGRP non-stop dans le vecteur pcDNA3-YFP digéré avec les enzymes BamH1 et Age1.

La construction pcDNA3-GFP-OB-RGRP-Luc a été obtenue par insertion du fragment OB-RGRP-Luc du vecteur pcDNA3-OB-RGRP-Rluc coupé par EcoR1, dans le site EcoR1 du vecteur pcDNA3-YFP. Le codon stop de la YFP a été éliminé par mutagenèse dirigée.

Le vecteur 6Myc-OBR-GRP (4TM) a été obtenu par insertion du fragment 6myc du vecteur pCDNA3-RSV-6Myc, dans les sites BamH1 et EcoR1 du vecteur pcDNA3-OB-RGRP. Les différentes délétions d'OB-RGRP (2 et 3 TM) ont été obtenus par PCR et insertion dans le vecteur pcDNA3 dans les sites EcoR1 et Xba1. La séquence codante de MY047 a été obtenue par RT-PCR

sur des ARNm d'origine humaine. Le fragment PCR a été digéré par les enzymes de restriction EcoR1/Xba1 et inséré dans le vecteur pcDNA3-Topaze coupé par les mêmes enzymes. Le codon stop de la YFP a ensuite été éliminé par mutagénèse dirigée pour obtenir le vecteur pcDNA3-YFP-MY047. Le vecteur pcDNA3-MY047-YFP a été obtenu par insertion du fragment d'ADN obtenu par PCR sur le vecteur pcDNA3-YFP-MY047 et coupé par BamH1, puis inséré dans le vecteur pcDNA3-YFP coupé par la même enzyme. L'insertion du même fragment dans le vecteur pcDNA3-Rluc coupé par BamH1 a permis d'obtenir le vecteur pcDNA3-MY047-Rluc. Deux réactions de PCR consécutives ont été réalisées pour obtenir une amplification du promoteur U6 de souris suivi de la séquence ARNi en épingle à cheveux de séquence SEQ ID N°42. Dans la première réaction, un premier couple d'amorces : U6 sens, 5'-CCATCTAGGCCAAGCTTATCCGACGCCCATCTC-3' SEQ ID N°41 et celle correspondant à la séquence sens de la cible suivie d'une séquence formant la boucle (SEQ ID N°39). Ce produit de PCR a ensuite été utilisé dans une seconde réaction avec le même primer sens (U6 sens) et avec une seconde amorce correspondant à la séquence anti-sens de la cible précédée de la même séquence formant la boucle (SEQ ID N°40). Les différents produits de PCR correspondant aux différents ARNi en épingle à cheveu ont été insérés dans le vecteur PCR3.1 à l'aide du kit TA-cloning (INVITROGEN Groningen, Pays-bas), pour donner les plasmides PCR3.1-RNAi 14. Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage.

Culture cellulaire et transfection.

Les cellules HEK 293, COS-7- et HeLa ont été cultivées dans du DMEM supplémenté avec 10 % (v/v) de SVF, 4,5 g/litre de glucose, 100 U/ml de pénicilline, 0,1 mg/ml de streptomycine, 1 mmol.L⁻¹ de glutamine (tous de Life Technologies, Gaithersburg, MD). Les transfections transitoires ont été réalisées avec le réactif FuGene 6 (Roche, Basel, Suisse) selon les instructions du fournisseur, sauf pour les cellules Ltk. Ces dernières ont été

transfectées par la technique d DEAE Dextran : Les cellules sont rincées deux fois au PBS puis 1 ml d'un mélange de 2µg d'ADN, DMEM, Hepes 20 mM, 4,5 g/litre de glucose et 200µg de DEAE-dextran est ajouté sur les cellules. Après une incubation de 8 heures, le milieu est retiré puis les
 5 cellules sont incubées pendant 1'30" avec 1 ml de DMEM, 4,5 g/litre de glucose et 10 % DMSO. Les cellules sont finalement rincées puis incubées avec le milieu de culture.

Préparation des membranes et solubilisation.

Les membranes ont été préparées comme décrit précédemment (19), et
 10 resuspendues dans du Tris 75 mmol.L-1 (pH 7,4), du MgCl₂ 12,5 mmol.L-1, et EDTA 5 mmol.L-1 et immédiatement utilisées dans des expériences de BRET.

SDS PAGE et Western.blot.

Les lysats totaux ont été préparés par lavage des cellules une fois au PBS
 15 froid (pH 7,4) et dénaturés par l'ajout de tampon de dépôt (30mmol.L-1 Tris HCl pH 6,8, 1 % glycérol 5 % SDS, 50 mmol.L-1 DTT et 0,05 % bromophenol blue). Les lysats totaux ou les immunoprécipités ont été incubés pendant 10 minutes à 90°C puis déposés sur gel d'acrylamide 10 % pour une séparation par électrophorèse (SDS-PAGE). Les protéines ont alors été
 20 transférées sur une membrane de nitrocellulose et révélées par des anticorps primaires spécifiques : anti-YFP (8367-1 Living Colors) au 1/200ème, anti-myc A14 (sc-789 TEBU Peprotech Santa Cruz Biotechnology) au 1/500ème, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (IgG de chèvre anti-lapin ; Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Baltimore Pike) au
 25 1/10000ème. Les bandes immuno-réactives ont été révélées par un kit ECL (Pharmacia Biotech).

Immunoprecipitation.

Deux jours après la transfection, les cellules ont été lavées une fois au PBS froid, et les protéines ont été extraites par une incubation pendant 15 minutes

dans du tampon de lyse (PBS 1X, Nonidet P40 1 %, Sodium Desoxycholate 0,5 %, SDS 0,1 %, NaN₃ 0,02 %, benzamidine 10 mg.L⁻¹ et des inhibiteurs de trypsine 5 mg.L⁻¹). Le lysat a été centrifugé à 18000 g pendant 15 min et le surnageant a ensuite été incubé pendant 3 heures à 4°C avec un anticorps
 5 anti-myc couplé à des billes d'agarose (sc-40AC TEBU preprotech, Santa CRUZ Biotechnology). Les précipités ont été lavés trois fois avec du tampon de lyse froid puis dénaturés avec du tampon de dépôt pour SDS-PAGE.

Expériences de radioliation.

Les expériences de radioliation ont été réalisées comme décrit
 10 précédemment (Barr et al. (1999) J Biol Chem, 274, 21416-21424), avec de légères modifications. Pour déterminer la liaison de la leptine en surface, les cellules cultivées en plaques 6 puits ont été lavées deux fois au PBS froid et incubées dans le tampon de liaison (DMEM, 25 mmol.L⁻¹ Hepes pH 7,4, 1 % BSA) contenant 100000 cpm/puit de ¹²⁵I-leptin (PerkinElmer life sciences,
 15 Paris, France) en présence ou non de 200 nmol.L⁻¹ de leptine (PeproTech Inc, USA) pendant 4 h à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois au PBS froid, puis lysées dans du NaOH 1N, et la radioactivité a été déterminée dans un compteur γ. Pour déterminer la liaison totale de la leptine, les cellules cultivées dans des boîtes de 10 cm de diamètre ont été solubilisées dans 1,5
 20 ml de tampon de liaison contenant 0,15% de digitonine pendant 2 h à 4°C. Les extraits ont été centrifugés 30 min à vitesse maximale et à 4°C. Les surnageants (0,2ml) ont été incubés avec 100000 cpm de ¹²⁵I-leptine en présence ou non de 200 nmol.L⁻¹ de leptine, dans un volume total de 0,25 ml en rotation constante à 4°C pendant une nuit. 0,5 ml de γ-globuline (1,25
 25 mg/ml) et 0,5 ml de polyéthylène glycol 6000 (25 % p/v) ont été ajoutés pour précipiter les complexes récepteurs-ligands, qui ont été centrifugés à 17000 g pendant 3 min. Le culot a été lavé une fois avec 1ml de polyéthylène glycol 6000 (12 % p/v) et la radioactivité a été déterminée dans un compteur γ.

Test d'activation des gènes rapporteurs.

Les cellules HeLa cultivées dans des puits de plaques 6 puits ont été co-transfectées avec 500 ng d'un plasmide rapporteur exprimant la luciférase de *firefly* sous le contrôle d'éléments de réponse pour les facteurs STAT3 ou STAT5, (gift of Dr. Levy, Université de New York, New York, USA), 250 pg du vecteur d'expression pcDNA3-luciférase de *Renilla* (utilisé comme standard interne entre les échantillons) et avec 500 ng des différents vecteurs d'expression des OB-R ou le vecteur seul. 48 h après la transfection, les cellules ont été mises à jeun pendant une nuit dans du milieu Otpimem (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) contenant 1 % de BSA, avant stimulation ou non par 10 nmol.L⁻¹ de leptine pendant 48 h. Les cellules ont alors été lavées une fois au PBS puis lysées dans du tampon de lyse passif (Promega Corporation, Madison, WI) pendant 15 min à température ambiante. Les lysats totaux ont été centrifugés pendant 2 min à 15000 g et les surnageants ont été utilisés dans un test de mesure de luciférase (Dual Luciferase Assay System de Promega Corporation, Madison, WI) en utilisant un luminomètre Berthold (Lumat LB 9507). Les résultats sont exprimés en rapport des activités de la luciférase de *firefly* sur la luciférase de *Renilla*.

Mesures de BRET en microplaques.

48 h après transfection, les cellules COS-7, HeLa ou HEK 293 exprimant les protéines de fusions des OB-R ont été détachées et lavées dans du PBS. 1-2x10⁵ cellules ont été distribuées dans des puits de plaques optiplat (96 puits, Packard Instrument Company, Meriden, CT) en présence ou non des ligands et incubées à 25°C. De façon alternative, nous avons procédé de la même façon avec des membranes préparées à partir des cellules exprimant les différentes constructions. Le substrat, la Coelenterazine h (Molecular Probes, Eugene, OR) a été ajouté à une concentration finale de 5 µmol.L⁻¹ et les lectures ont été réalisées avec un lumino/fluorimètre FusionTM (Packard Instrument Company, Meriden, CT) qui permet la mesure de la luminescence à travers deux filtres (filtre Luciférase: 485 ± 10 nm; filtre YFP: 530 ± 12.5

nm). Le rapport de BRET a été défini comme la différence d'émission à 530 nm/485 nm des cellules co-transfectées avec les protéines de fusion Luc et YFP et l'émission à 530 nm/485 nm de la protéine de fusion Luc transfectée seule dans les cellules. Les résultats sont exprimés en unités de
 5 milliBRET (mBU), 1 mBRET correspond aux valeurs des différences des ratios multipliées par 1000.

RT-PCR.

Les ARN totaux ont été extraits par la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski P., et Sacchi N. (1987) Anal. Biochem. 162, 156-159). 1 µg
 10 d'ARN est dénaturé pendant 5 minutes à 68°C puis refroidit brutalement pendant 5 min à 4°C. L'échantillon dénaturé est reverse-transcrit pendant 1 h à 37°C dans 20 µl de milieu réactionnel RT (5µmol.L⁻¹ PdN6, 10µmol.L⁻¹ DTT, 50mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH=8,3, 75mmol.L⁻¹ KCl, 5mmol.L⁻¹ MgCl₂, 500 µmol.L⁻¹ dNTP, 200U RT-MMLV). Un aliquote de 2,5 µl de cette réaction est
 15 utilisé pour une réaction de PCR dans un volume final de 25µl (40mmol.L⁻¹ Tris-HCl pH 8,4; 100 mmol.L⁻¹ KCl; 1,5 mmol.L⁻¹ MgCl₂; 0,2mmol.L⁻¹ de chaque dNTP; 0,141mmol.L⁻¹ d'amorces spécifiques d'OB-RGRP (sens humain: CCGTGGCAGGAAGC **SEQ ID N°43**, sens murin: GCAGCGACAGCCCCAGCTCC **SEQ ID N°44** antisens: CAGCCACACGAGCAAG **SEQ ID N°45**), et 0,035mmol.L⁻¹ d'amorces
 20 spécifiques de la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) (sens: GGAGAAGGCTGGGGC **SEQ ID N°46**, antisens: GATGGCATGGACTGTGG **SEQ ID N°47**) et 2,5U de TAQ DNA polymérase). Le protocole suivant a été utilisé pour la réaction de PCR : Dénaturation
 25 initiale de 3 min à 94°C, puis 22 à 30 cycles de dénaturation (20 sec à 94°C), hybridation (20 sec à 59°C), élongation (20 sec à 72°C) suivie par une élongation finale de 7 min à 72°C.

Un aliquote de la réaction de PCR est déposé sur un gel d'agarose à 2% pour séparer les produits de la réaction par électrophorèse. Les tailles attendues

des fragments de la GAPDH et d'OBR-GRP sont respectivement de 229 pb et 334 pb.

Synthèse d'oligonucléotides

Les oligonucléotides ont été synthétisés sur synthétiseur automatique d'ADN (modèle 8909 "Expedite MOSS" d'Applied Biosystems) par chimie standard de phosphoramidites et oxydation à l'iode. La déméthylation a été effectuée par une solution à 0,2 mol.L-1 de 3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxyde dans l'acétonitrile pendant 120 s. Le détachement du support et la déprotection ont été réalisés en ammoniac concentré (18 h à 55°C), puis les oligonucléotides ont été purifiés par précipitation. Le produit de déprotection a été précipité par 10 volumes de 1-butanol; le culot repris dans un volume de NaCl à 0,3 mol.L-1 a été reprécipité par l'addition de 4 volumes d'éthanol.

L'analyse par gel de polyacrylamide à 20 % (en tampon urée 8 mol.L-1 et Tris-borate 454 mmol.L-1 à pH 7,0) a montré une proportion supérieure à 80 % de produit de longueur attendue.

Transfection des OligoDesoxyNucleotides antisens et du duplex d'ARN interférant synthétiques.

Pour la transfection de 300 000 cellules cultivées dans un puit de plaque 6 puits, 10 µL d'ODN antisens à 20 µmol.L-1 ou 10 µL du duplex d'ARN interférant à 20 µM ont été dilués dans 175 µL de DMEM. 3 µL d'oligofectamine (Invitrogen, Groningen, Pays-bas) et 12 µL de DMEM ont été incubés dans un second tube pendant 10 min à température ambiante. Le mélange oligofectamine / DMEM est alors ajouté à l'ODN antisens dilué, vortexé et incubé 20 min à température ambiante. Pendant ce temps, les cellules sont lavées une fois au PBS, une fois au DMEM, puis recouvertes de 800 µl de DMEM. Le mélange ODN / oligofectamine a alors été ajouté goutte à goutte sur les cellules et incubé 4h à 37°C avant l'ajout de 500 µl de DMEM supplémenté avec 30 % de sérum.

Exemple 1 : Topologie et localisation cellulaire d'OB-RGRP.

Pour étudier la topologie et la localisation subcellulaire d'OB-RGRP, nous avons étiqueté la protéine avec le variant jaune de la Green Fluorescent Protéine (YFP) à l'extrémité de sa queue C-terminale. La protéine de fusion a
 5 été exprimée dans les cellules HeLa et sa localisation a été déterminée par microscopie de fluorescence.

Les résultats montrent que la protéine de fusion est ciblée préférentiellement au niveau des membranes périnucléaires et dans des vésicules intracellulaires. Des résultats similaires ont été observés dans les cellules
 10 HEK. Aucune co-localisation avec des protéines cytoplasmique et nucléaires n'ont été observées, confirmant la localisation d'OB-RGRP au niveau de membranes (non montré). La nature exacte du compartiment membranaire a été déterminé par des études de co-localisation avec des marqueurs spécifiques de compartiment subcellulaires. Une forte co-localisation a été
 15 observée avec la chaîne invariante des protéines de classe II du CMH, un marqueur du compartiment endocytaire.

L'analyse initiale de la topologie d'OB-RGRP suggérait une organisation en 3 domaines transmembranaires (TM) Bailleul et al (1997) Nucleic Acids Research 25, 2752-2758). Une organisation similaire a été proposée pour
 20 MY047 (Huang et al. 2001) Biochimica et Biophysica acta. Gene structure and expression 327-331). Cependant, une nouvelle analyse du profil d'hydrophobicité des différentes séquences protéiques disponibles pour OB-RGRP et MY047 est aussi compatible avec un modèle à 4 TM (Fig. 2). La topologie diffère profondément entre ces deux modèles. Dans le modèle à 3
 25 TM, les extrémités N- et C-terminales sont localisées de chaque côté de la membrane, alors que dans le modèle à 4 TM, les deux queues sont orientées du même côté de la membrane (Fig. 3a). Pour déterminer le bon modèle, nous avons utilisé la méthode de transfert d'énergie par résonance (BRET), qui a récemment été développée pour suivre les interactions protéine-
 30 protéine dans les cellules vivantes (Xu et al. (1999) Proc Natl Acad Sci U S A

96, 151-156) . Dans le cas d'une proximité physique ($< 100 \text{ \AA}$) entre les deux protéines interagissant, un transfert d'énergie peut avoir lieu entre le donneur d'énergie (Luc) et l'accepteur d'énergie (YFP), fusionnés aux deux protéines d'intérêt. Nous avons étiqueté la queue N-terminale d'OB-RGRP avec la YFP, la queue C-terminale avec la luciférase, et nous avons observé le transfert d'énergie par des mesures de BRET avec cette double protéine de fusion. Le modèle à 3 TM ne permet pas de transfert puisque les deux partenaires de BRET sont séparés par la bicouche lipidique. Le modèle à 4 TM au contraire prévoit un fort transfert d'énergie puisque les deux partenaires sont localisés du même côté de la membrane. Comme montré dans la figure 3b, un très fort transfert d'énergie a été détecté pour la double protéine de fusion dans les cellules intactes, indiquant qu'OB-RGRP possède 4 TM.

L'ensemble de ces résultats suggère qu'OB-RGRP est une protéine membranaire à 4 domaines transmembranaires, possédant 3 courtes boucles et des extrémités N- et C-terminales courtes orientées du même côté de la membrane. OB-RGRP est majoritairement localisée dans des compartiments intracellulaires.

Exemple 2: Oligomérisation d'OB-RGRP.

L'oligomérisation est une propriété commune à différentes protéines y compris des protéines membranaires comme les récepteurs tyrosine kinase, les récepteurs aux cytokines et les phosphotyrosines phosphatase. Il a été montré que cette oligomérisation joue un rôle important dans la fonction de ces protéines. Pour obtenir des éléments dans la fonction d'OB-RGRP, nous avons voulu savoir si cette protéine oligomérisé.

OB-RGRP a été étiquetée avec la YFP à sa queue C-terminale et exprimée dans des cellules HeLa. Les protéines ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante (PAGE-SDS) et des expériences d'immunoblot ont été réalisées avec un anticorps anti-YFP. La figure 4a révèle plusieurs bandes spécifiques d'OB-RGRP-YFP, correspondant à des formes monomériques, dimériques et des complexes

oligomériques. Des résultats similaires ont été obtenus avec OB-RGRP étiquetée en N-terminal soit avec la YFP ou un épitope myc (Fig. 4 a,b). La formation des oligomères d'OB-RGRP a été observée sur des extraits cellulaires totaux après immunoprécipitation. L'utilisation d'un cross-linker sur
 5 les cellules entières, stabilise les complexes dimériques, indiquant que la forme dimérique est la forme prédominante d'OB-RGRP dans les cellules intactes (Fig. 4a).

De façon surprenante, OB-RGRP a des propriétés inattendues puisque les oligomères sont stables en présence de différents agents dénaturant et/ou
 10 dissociant comme le SDS 5 %, le Triton X-100 1 %, le Nonidet P40 1 %, la digitonin 1 %, le DTT 50 mmol.L⁻¹ et le β -mercaptoethanol 2 %. Cependant, des observations similaires ont été obtenues pour d'autres protéines membranaires comme la glycophorine A et les récepteurs β 2-adrenergiques couplés aux protéines G. Des études sur ces protéines montrent
 15 respectivement que des motifs LIXGVXXG et LXXXGXXXGXXXL dans les domaines transmembranaires sont essentiels pour la formation des oligomères. Des motifs similaires ont été identifiés dans les régions membranaires d'OB-RGRP.

Pour identifier les déterminants moléculaires impliqués dans la dimérisation,
 20 nous avons réalisé des constructions d'OB-RGRP présentant des délétions progressives de la queue C-terminale (Fig. 5). Une construction contenant les deux premiers TM potentiels perd la capacité de former des oligomères. L'addition du 3^{ème} TM restaure la possibilité de former des dimères. Cependant, le profil complet d'oligomérisation a seulement été observé en
 25 présence des 4 TM potentiels.

Les oligomères de protéines membranaires peuvent être des artefacts induit durant la préparation des échantillons (solubilisation, dénaturation etc.). C'est pourquoi il est important de vérifier l'oligomérisation des protéines dans des cellules vivantes. Les techniques de transfert d'énergie développées
 30 récemment comme le BRET permettent de suivre de telles interactions protéines-protéines dans les cellules vivantes. Des protéines de fusions

d'OB-RGRP avec la luciférase et la YFP ont été utilisées pour suivre l'oligomérisation d'OB-RGRP dans les cellules vivantes. La co-expression des constructions OB-RGRP-YFP ou YFP-OB-RGRP avec la construction OB-RGRP-Luc induit un transfert d'énergie (Fig. 6a). La spécificité de cette interaction a été montrée par l'absence de transfert d'énergie lors de la co-expression avec deux protéines de fusions différentes : la β arrestine2-YFP (Angers et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A 97, 3684-3689) , ou le récepteur MT2 de la mélatonine-Luc (Ayoub et al. (2002) J Biol Chem 277, 21522-21528) . Nous avons alors exprimés différents rapports des partenaires de BRET (Fig. 6b). Le signal de BRET est augmenté de façon hyperbolique en fonction du ratio OB-RGRP-YFP / OB-RGRP-Luc, atteignant une asymptote qui correspond à la saturation des molécules donneurs d'énergie (OB-RGRP-Luc) par les molécules accepteurs (OB-RGRP-YFP), ce qui est attendu dans le cas d'une interaction spécifique.

Collectivement, ces résultats montrent qu'OB-RGRP est une protéine membranaire dimérique qui peut aussi être engagées dans des complexes oligomériques de plus haut poids moléculaire. Les 3ème et 4ème domaines transmembranaires potentiels semblent être important pour la formation des oligomères.

20 **Exemple 3: Interaction entre les OB-R et OB-RGRP et MYO47.**

Nous avons utilisé la technologie de BRET pour étudier une possible interaction entre les OB-R et OB-RGRP dans les cellules vivantes. Un transfert d'énergie a été observé de façon constitutive dans les cellules co-exprimant la construction OB-R_s-Luc et la construction OB-RGRP-YFP indiquant une proximité des partenaires d'interaction (Fig. 7). Les mêmes résultats ont été obtenus dans des cellules co-exprimant OB-R_s-Luc et la construction MYO47-YFP, ainsi que dans l'orientation inverse : dans des cellules co-exprimant OB-RGRP-Luc et OB-R_s-YFP, ou dans des cellules co-exprimant MYO47-Luc et OB-R_s-YFP. La spécificité de ces interactions a été confirmée par l'absence de transfert d'énergie entre OB-R_s-Luc, OB-RGRP-

Luc, MYO47-Luc et une construction du récepteur de l'insuline étiqueté avec la YFP (Boute et al. (2001) Mol Pharmacol 60, 640-645) , ainsi que dans l'orientation inverse : par l'absence de transfert d'énergie entre une construction du récepteur de l'insuline étiqueté avec la Luc et les constructions OB-R_s-YFP, OB-RGRP-YFP et MYO47-YFP. La co-expression d'OB-R_s-Luc et une construction d'OB-RGRP ou de MYO47 présentant l'étiquette YFP en N-terminal ne provoque pas de signal significatif, confirmant la spécificité de l'interaction avec OB-RGRP-YFP et MYO47 et indique que l'extrémité N-terminale d'OB-RGRP et MYO47 doit être impliquée dans l'interaction avec OB-R.

Aucun transfert d'énergie significatif n'a été observé dans les cellules co-exprimant les constructions OB-R_i-Luc et OB-RGRP-YFP ou YFP-OB-RGRP. Ceci n'est pas dû à une absence d'expression fonctionnelle OB-R_i-Luc puisqu'un signal de BRET spécifique a été observé dans des cellules co-exprimant OB-R_i-YFP pour suivre la dimérisation des OB-R. L'absence de BRET entre les protéines de fusions OB-R_i-Luc et OB-RGRP-YFP n'exclue pas une interaction directe entre ces deux protéines puisque cela peut être expliqué par le fait que la distance entre les deux partenaires de BRET (Luc et YFP) soit plus importante que 100 Å, la distance maximale permettant d'obtenir un transfert. Cela doit être le cas puisque les extrémités N- et C-terminales d'OB-RGRP doivent être localisées proche de la région transmembranaire des OB-R, alors que l'extrémité C-terminale d'OB-R_i doit plus probablement pointer vers le cytoplasme à cause de sa longue queue intracellulaire d'environ 300 acides aminés. Etant donné que les isoformes courte et longue des OB-R partagent les mêmes régions trans- et juxta-membranaire et que l'interaction d'OB-RGRP avec OB-R_s est localisée à ce niveau, il est probable qu'OB-RGRP interagisse avec OB-R_i de la même manière qu'avec OB-R_s.

Exemple 4: Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur la signalisation des OB-R.

Des constructions contenant des éléments de réponse pour STAT3- ou STAT5-en amont d'un gène reporter luciférase ont été co-exprimées avec
 5 OB-R_i en absence ou en présence de différentes constructions d'OB-RGRP (Fig. 8). Les deux constructions ont été activées par la leptine de façon dose dépendante avec un EC50 d'environ 50 pM. Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HEK 293 exprimant de façon stable un gène rapporteur pour STAT3. La surexpression de différentes constructions d'OB-
 10 RGRP n'a pas eu d'effet reproductible sur cette activation indiquant qu'OB-RGRP n'est pas un facteur limitant.

Exemple 5: Effet de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface.

Dans des levures knock-out pour OB-RGRP (Vps55), le transport de
 15 protéines est perturbé entre le golgi et les vacuoles (Belgareh-Touze et al. (2002) Molecular Biology Of The Cell 13, 1694-1708). Bien que les OB-R soit activés uniquement lorsqu'ils sont exprimés à la membrane plasmique, une quantité importante de récepteurs est accumulée dans des compartiments intracellulaires (Barr, et al. (1999) J Biol Chem, 274, 21416-21424)(Lundin et
 20 al. (2000) Biochimica et Biophysica Acta 1499, 130-138). C'est pourquoi nous avons testé les effets de la surexpression d'OB-RGRP sur l'expression des OB-R à la surface des cellules.

La répartition des récepteurs a été étudiée par des expériences de liaison de ¹²⁵I-leptine. En accord avec d'autres auteurs (Barr et al. 1999), nous avons
 25 montré que seulement 10 – 20 % des récepteurs OB-R_i et OB-R_s sont exprimés à la surface de cellules COS transfectées (Fig. 9) et des cellules HeLa. Ce n'est pas un artéfact due à l'expression de récepteurs xogènes car des valeurs similaires sont obtenues dans des cellules HEK 293 exprimant des récepteurs endogènes OB-R (Fig. 9). La surexpression d'OB-

RGRP n'a pas montré de modification de la quantité totale dans les cellules, et le % de récepteurs exprimés à la surface (Fig. 9).

Exemple 6 : Caractérisation de desoxynucléotides antisens spécifiques d'OB-RGRP

- 5 OB-RGRP semble avoir une expression ubiquitaire, c'est pourquoi la diminution de l'expression de cette protéine a été choisie comme approche alternative pour étudier son rôle dans la fonction des OB-R. Quatorze antisens spécifiques pour OB-RGRP (AS 1 à 14 ; **SEQ ID N°22 à SEQ ID N°34 et SEQ ID N°2**) et deux antisens aléatoires (AS 15 et 16 ; **SEQ ID N°35 et SEQ ID N°36**) ont été choisis (voir Figure 1), synthétisés puis testés pour leur capacité à inhiber l'expression d'OB-RGRP par des expériences de RT-PCR semi-quantitative dans les cellules HeLa exprimant OB-RGRP de façon endogène (Fig. 10). Seul un de ces antisens (AS-14), dérivé de la région 3' non traduite de l'ARNm d'OB-RGRP interfère avec l'expression d'OB-RGRP.
- 10
- 15 Le marquage de cet antisens avec le fluorophore Cy3 a permis de montrer que l'ensemble des cellules était transfecté avec nos conditions expérimentales, lors de nos différentes expériences.

Exemple 7: Effet des différents ARN interférants sur le niveau des messagers d'OB-RGRP observés par RT-PCR semi-quantitative.

- 20 Afin de diminuer l'expression d'OB-RGRP, une approche alternative a été d'utiliser des ARN interférant. Pour cela, nous avons utilisé d'une part, une séquence candidate ARN interférant synthétique dirigée à la fois contre la séquence humaine et murine (figure 11a) ; et d'autre part, un vecteur (PCR3.1-RNAi 14) exprimant un ARN interférant en épingle à cheveux dirigé
- 25 contre une séquence murine d'OB-RGRP (figure 11c).
- La capacité des ARNi à diminuer l'expression d'OB-RGRP endogène a été testée par RT-PCR.
- L'ARNi synthétique transfecté dans des cellules HELA (d'origine humaine) provoque une diminution de l'expression d'OB-RGRP humaine.

La transfection du vecteur PCR3.1-RNAi-14 provoque le même effet dans des cellules L (d'origine murine).

Exemple 8: Effet de l'antisens spécifique d'OB-RGRP sur la signalisation et l'expression en surface des OB-R.

5 Les cellules HeLa ont d'abord été co-transfectées avec les vecteurs d'expression d'OB-R_i et le gène rapporteur pour STAT3 puis avec les antisens. La leptine provoque une augmentation de l'activation basale du gène rapporteur pour STAT 3 d'environ 1,5 fois dans les cellules contrôles sans antisens, ou avec un antisens contrôle (AS16) (Fig. 12). Dans les
10 cellules transfectées avec l'antisens spécifique pour OB-RGRP (AS-14), la signalisation basale et stimulée par la leptine est relativement augmentée par rapport aux conditions contrôles. Ceci montre que l'activation de la voie JAK/STAT est augmentée dans les cellules présentant une diminution de l'expression d'OB-RGRP. Ces observations peuvent être expliquées par un
15 effet inhibiteur d'OB-RGRP sur l'activité basale et stimulée des OB-R, et dans ce cas, OB-RGRP peut être considérée comme un régulateur de la signalisation des OB-R. Une autre alternative est qu'OB-RGRP pourrait réguler l'expression des récepteurs en surface en limitant le nombre des OB-R atteignant la surface des cellules. Ceci est en accord avec le fait que
20 seulement 10 à 20 % des récepteurs exprimés atteignent la surface cellulaire. Dans cette hypothèse, la diminution de l'expression d'OB-RGRP devrait augmenter le nombre de récepteurs à la surface des cellules, ce qui devrait augmenter la signalisation par ces récepteurs. Pour tester cette hypothèse, nous avons quantifié le nombre de récepteurs OB-R_i et OB-R_s exprimés à la
25 surface des cellules en présence (contrôle) et en absence (AS-14) d'OB-RGRP (Fig. 13). La transfection de l'antisens aléatoire n'a pas montré d'effet sur le nombre de récepteurs exprimés à la surface des cellules, alors que celle de l'antisens spécifique (AS-14) a provoqué une augmentation de 3 fois du nombre des OB-R exprimés à la membrane plasmique. Des résultats

similaires ont été obtenus dans des cellules HeLa non transfectées exprimant des récepteurs endogènes. Dans ces conditions expérimentales, le nombre total de récepteurs, mesuré par des expériences de liaison de ^{125}I -leptine, n'a pas montré de variations significatives.

- 5 L'ensemble de nos résultats est consistant avec le rôle d'OB-RGRP chez la levure, dans le transport des protéines. L'augmentation de l'expression en surface des OB-R semble impliquée dans l'augmentation de la signalisation observée. Cependant, nous ne pouvons pas totalement exclure l'hypothèse qu'OB-RGRP régule directement l'activité des OB-R. L'application d'antisens
 - 10 spécifiques dirigés contre OB-RGRP devrait être utile pour augmenter la signalisation des OB-R dans les désordres associés à la leptine, comme l'obésité humaine où l'on observe une résistance à la leptine, caractérisée par une réponse inadaptée à cette hormone. L'augmentation de l'expression des récepteurs à la surface des cellules et de leur signalisation doit être
 - 15 importante pour augmenter la réponse à la leptine dans le cas de l'obésité humaine, premièrement par augmentation du transport de la leptine vers le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique et deuxièmement par une augmentation de la signalisation des OB-R au niveau de l'hypothalamus.
- L'interaction entre OB-RGRP et OB-R_s laisse supposer que l'action d'OB-
- 20 RGRP se fait par cette interaction directe avec les récepteurs et qu'empêcher celle-ci peut conduire à reproduire les effets de l'ODN antisens spécifique. Nous proposons d'utiliser le test de BRET des interactions entre OB-RGRP et OB-R_s, et MYO47 et OB-R_s décrit plus haut, comme test de criblage de molécules pouvant moduler cette interaction. Ce test pourra être réalisé soit
 - 25 sur des cellules entières ou perméabilisées, co-exprimant les protéines de fusions des partenaires de BRET d'OB-RGRP et d'OB-R_s ou de MYO47 et d'OB-R_s, soit sur des fractions membranaires issues de ces cellules.

REVENDICATIONS

1. Oligonucléotide éventuellement modifié comprenant de 8 à 50
nucléotides qui hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 1
5 et inhibe l'expression de OB-RGRP.
2. Oligonucléotide selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il favorise
l'expression des récepteurs de la leptine à la surface cellulaire.
- 10 3. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 et 2 caractérisé en ce
qu'il est un antisens.
4. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce
qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60 %
15 avec la séquence SEQ ID N° 2.
5. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce
que des nucléotides sont thioestérifiés.
- 20 6. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce
que des nucléotides sont 2' O-méthylés.
7. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce
qu'il présente un résidu triéthylèneglycol à son extrémité 3'.
25
8. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce
qu'il est simple brin.
9. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce
30 qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60 %
avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions

2, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont thioestérifiés.

- 5 10. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 8 caractérisé en ce qu'il comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60 % avec la séquence SEQ ID N°2, dans laquelle les nucléotides en positions 1, 2, 3, 4, 5, 16, 17, 18, 19 et 20, dans le sens 5' vers 3', sont 2' O-méthylés.
- 10 11. Oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 10 caractérisé en ce qu'il est un ADN.
- 15 12. Oligonucléotide de type ARNi comprenant de 10 à 60 nucléotides caractérisé en ce qu'il hybride de manière spécifique à la séquence SEQ ID N° 21 et inhibe l'expression de OB-RGRP.
13. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est un ARN double brin.
- 20 14. Vecteur exprimant un oligonucléotide selon l'une des revendications 1 à 4 et 12.
15. Cellule contenant un vecteur selon l'une des revendications 13 et 14.
- 25 16. Médicament contenant un oligonucléotide, un vecteur ou une cellule selon l'une des revendications 1 à 15.
- 30 17. Composition pharmaceutique contenant une quantité pharmacologiquement active d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 et des excipients pharmaceutiquement acceptables.

18. Utilisation d'un oligonucléotide, d'un vecteur ou d'une cellule selon l'une des revendications 1 à 15 pour la fabrication d'un médicament pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.
- 5 19. Protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'une séquence présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou avec la séquence SEQ ID N°16, ou d'une partie substantielle de la séquence SEQ ID N°4 ou de la séquence SEQ ID N°16, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou
10 d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.
20. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est une luciférase.
- 15 21. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que la protéine est la GFP ou un mutant de cette protéine ou la DsRed .
22. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce que le mutant de la GFP est la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.
- 20 23. Protéine de fusion selon la revendication 19 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°18 ou SEQID N°20.
- 25 24. Acide nucléique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 19 à 23.
- 30 25. Acide nucléique selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQID N°5, SEQID N°7, SEQID N°17 ou SEQID N°19.

26. Acide nucléique présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence selon la revendication 25.
27. Acide nucléique hybridant dans des conditions de forte stringence avec la séquence selon la revendication 25.
28. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 24 à 27.
29. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 19 à 23.
30. Fragments de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
31. Lysat de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
32. Membranes de cellules selon l'une des revendications 28 et 29.
33. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :
- mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer l'interaction entre la protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.

34. Procédé de détermination de la modification de l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine par un composé comprenant les étapes consistant à :
- 5 -mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
- 10 -à mesurer le transfert d'énergie.
35. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la
- 15 luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 22.
36. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que la protéine de
- 20 fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion selon la revendication 20, et la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.
- 25
37. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.
- 30
38. Procédé selon la revendication 34 caractérisé en ce que le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester et de la leptine (ou

un ligand du récepteur), est comparé à celui mesuré en présence du composé en absence de leptine (ou un ligand du récepteur).

- 5 39. Procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :
 - mettre en contact ledit composé avec une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer l'interaction entre une protéine présentant une identité d'au moins 65 % avec la séquence SEQ ID N°4 ou la séquence SEQ ID N°16, et le récepteur de la leptine.
- 10
- 15 40. Procédé selon l'une des revendications 34 et 35 caractérisé en ce que la protéine de fusion est une protéine de séquence SEQID N°6, SEQID N°8, SEQID N°12, SEQID N°14, SEQID N°18 ou SEQID N°20.
- 20 41. Procédé selon l'une des revendications 33 à 40 caractérisé en ce que les cellules sont traitées par un agent perméabilisant.
- 25 42. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est un ARNi double-brin dont au moins l'un des deux brins comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60 % avec l'une des séquences SEQ ID N°37 ou SEQ ID N°38.
- 30 43. Oligonucléotide selon la revendication 12 caractérisé en ce qu'il est un ARNi simple brin et comprend une séquence présentant une identité d'au moins 60 %, avec la séquence SEQ ID N°42.

44. Oligonucléotide selon la revendication 43 caractérisé en ce le ARNi comprend une boucle.

FRAV2003/0005

BREVET D'INVENTION**OLIGONUCLEOTIDES INHIBANT L'EXPRESSION DE LA PROTEINE OB-
RGRP ET PROCEDE DE DETECTION DE COMPOSES MODIFIANT
L'INTERACTION ENTRE LES PROTEINES DE LA FAMILLE DE OB-RGRP
ET LE RECEPTEUR DE LA LEPTINE****AVENTIS PHARMA S.A.****INSERM****CNRS****ABREGE**

La présente demande a pour objet des oligonucléotides inhibant l'expression de la protéine OB-RGRP et leurs utilisations pour la prévention et / ou le traitement de pathologies liées à la leptine.

Elle est en outre relative à un procédé de détection de composés modifiant l'interaction entre les protéines de la famille d'OB-RGRP et le récepteur de la leptine. Cette détection peut être effectuée par mesure du transfert d'énergie entre des protéines de fusion composées de ces protéines et de protéines donneurs et accepteurs d'énergie.